

I. SIBUL

HUMISOOLI TOIMEST ERÜTROTSÜÜTIDE ADENOSIIN- TRIFOSFATAASI AKTIIVSUSESSE*

Meie andmetel pärsib humisool valgete hiirte aju homogenaatides adenosiintrifosfataasi (ATF-aasi) aktiivsust ning tugevdab oksüdatiivse fosforüleerumise seost (Сибуль, 1960, 1961, 1962, 1963; Sibul, 1966). Need tähelepanekud võimaldasid teha järelduse, et humisooli kui ravimpreparaadi neurotroopsed omadused on põhjustatud tema toimest makroergiliste fosforiühendite ainevahetusse. Käesolevas töös uurisime humisooli toimet ATF-aasi aktiivsusesse küüliku erütrotsüütides kui makroergilise glükolüütilise ainevahetusega ning ainult membraan-ATF-aasi sisaldavates rakkudes. Pealegi on erütrotsüüdid oma hõlpsa kättesaadavuse tõttu krooniliseks katseks sobivad.

Uuemate andmete põhjal on membraan- ehk transpordi-ATF-aas vajalik naatriumi- ja kaaliumi-ioonide transportimiseks läbi raku membraanide ning üldse raku selektiivseks permeaabluseks (Skou, 1965). Erütrotsüütide ATF-aasi võimalikule osatähtsusele ionide transportimisel läbi raku membraani viitasid esimestena T. Venkster ja V. Engelhardt (Венкстерн, Энгельгардт, 1955). Hiljem R. L. Post jt. (1960) näitasidki magneesiumiga aktiveeritavate naatriumi- ja kaaliumi-ioonide transpordist osavõtva ATF-aasi esinemist erütrotsüütides. See membraan-ATF-aas eksisteerib kahes vormis: ouaubainiga ehk strofantiin G-ga pärsitaval ja mittepärsitaval kujul (Nakao jt., 1963).

Metoodika

Katseloomadena kasutati küülikuid, kellel ATF-aas erütrotsüütidest osmootsel hemolüüsil vabaneb. Kõrvaveenist võetud ning hepariiniga hüübimatuks muudetud veri tsentrifugeeriti. Saadud raku massi pesti naatriumkloriidi isotoonilises lahuses kolm korda, mis tõstis fermenti aktiivsuse kuni kahekordseks. Erütrotsüütide massile lisati 2 osa jääkülma destilleeritud veit ja hoiti veel 15 minutit jääs. Seepeale inkubeeriti hemolüsaati, koguses 0,4 ml, 30 minuti vältel 37° C juures järgmiste ingredientidega: 0,6 ml 0,1N glükokollpuhvrit (pH 7,8), 0,3 ml 0,01M MgCl₂, 0,4 ml 0,04M ATF, 0,3 ml destilleeritud vett (*in vitro* katseis sisaldas humisooli).

Pärast inkubatsiooniaja möödumist lisandati proovile 2 ml 20%-list triklooräädikhappelahust ja lasti proove seista toatemperatuuris 20 minutit. Seejärel nad filtriti. Kontrollproovile lisandati triklooräädikhapet enne selle inkubeerima panekut. ATF-aasi aktiivsus hemolüsaadis määrati katse- ja kontrollproovis sisalduva anorgaanilise fosfori diferentsi alusel mikrogrammides 0,05 ml hemolüsaadi kohta. Anorgaanilist fosforit määrati Fiske-Subbarow' meetodiga, kasutades eukenogeneeni asemel askorbiinhapet. Olenevalt hemolüsaatide hemoglobiinisisaldusest korrigeeriti ATF-aasi aktiivsuse näitajad 60%-lise hemoglo-

* Töö on teostatud ENSV TA Eksperimentaalse ja Kliinilise Meditsiini Instituudis 1963. aastal.

biini tasemele. Katseküülilid said humisooli kuuriviisi: 20–25 päeva kestel 4–5 kg raskuse küüliku kohta iga päev subkutaanselt 1 ml lahenduses 1:100 naatriumkloriidi isotoonilises lahuses. *In vitro* katsetes lisandati humisool hemolüsaadi inkubatsiooni-sesusse.

Uurimistulemused

Küüliku erütrotsüütide ATF-aasi aktiivsuse aritmeetiline keskmine meie katsetes oli 19,0, nagu selgub tabelist. Fermendi aktiivsus individuaalselt oli seejuures väga varieeruv. Minimaalne ja maksimaalne aktiivsus erinesid aritmeetilisest keskmisest enam kui $\pm 50\%$. ATF-aasi aktiivsuse individuaalse taseme suure varieeruvuse põhjused on näiliselt kahesugused. Esiteks on nad tingitud loomadele omasest kas kõrgemast või madalamast ATF-aasi aktiivsuse tasemest; teiseks — ATF-aasi aktiivsuse dünaamilisest muutlikkusest. Näit. leidsime eelkatsetes 8 küüliku juures, et määrates ühe kuu jooksul ATF-aasi aktiivsust teistkordselt, oli see enam kui pooltel katseloomadel tunduvalt muutunud.

Tabelis toodud andmed näitavad ATF-aasi aktiivsust vahetult enne humisoolikuuri algust. Siit selgub, et esimeses katseseerias oli fermendi aktiivsuse aritmeetiline keskmine tunduvalt madalam kui teises ja kolmandas. Seda põhjustas ATF-aasi väga madal algväärtus üksikutel küülikutel esimeses katseseerias, mis avaldas mõju kogu rühma vastavale aritmeetilisele keskmisele. Humisoolikuuri toimet ATF-aasi aktiivsusesse uuriti kahel kuni kolmel korral. Et saada paremat ülevaadet fermendi aktiivsuse muutuste dünaamikast, selleks määrati seda igas katseseerias eri aegadel. Humisoolikuuri kestel täheldatud ATF-aasi aktiivsuse muutused esitatakse tabelis.

Humisoolikuuri toime erütrotsüütide ATF-aasi aktiivsusesse

Katse- seeria	Katse- loo- made arv	ATF-aasi aktiivsus, $\mu\text{g P}$						
		enne humisooli süstimist	3-ndal	8-ndal	10-ndal	15-ndal	20-ndal	25-ndal
I	6	M $\pm m$	14,8 4,4	14,4 1,4		13,0 0,5		26,0 1,8
II	6	M $\pm m$	22,5 2,2		7,7 1,4			20,8 3,0
III	6	M $\pm m$	19,7 1,2			12,7 1,4	9,8 0,58	
Kokku	18	M $\pm m$	19,0 1,7					

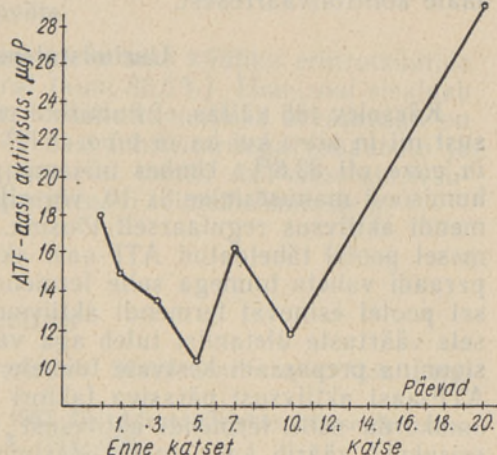
$P_{dij} < 0,2$ (II vs I) $P_{dij} < 0,001$ (I vs II) $P_{dij} < 0,001$ (III vs I) $P_{dij} < 0,01$ (III vs II) $P_{dij} < 0,01$ (III vs I) $P_{dij} < 0,05$ (III vs II)

Tabelist selgub, et kõige madalamad olid ATF-aasi näitajad 8., 10. ja 15. katsepäeval. Seega langeb fermendi aktiivsus humisoolikuuri tagajärjel kuuri esimesel poolel minimaalsele tasemele. Esimeses katseseerias polnud langus veel statistiliselt usaldatav, kuid oli seda täielikult juba teises ja kolmandas katseseerias. Suhteliselt väike ATF-aasi aktiivsuse langus esimeses katseseerias oli tingitud selle fermendi madalatest lähteväärtustest mõnedel vastava rühma küülikutel. Nii ei täheldatud nendel humisooli manustamise 10. päeval ATF-aasi aktiivsuse langust,

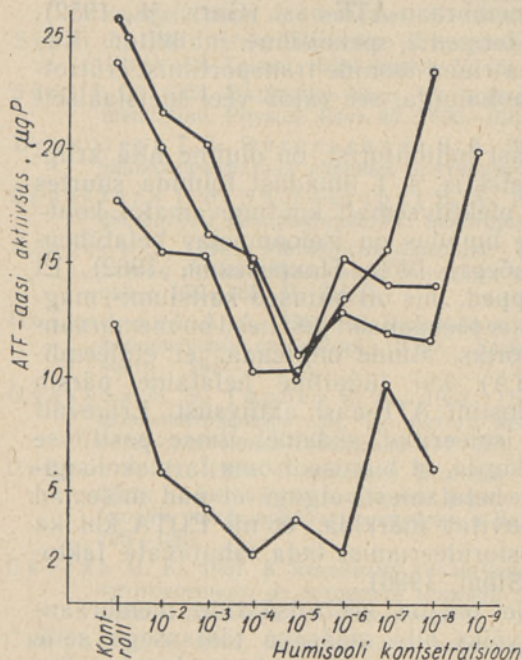
vaid koguni tõusu. Kõigil küülikutel aga, kellel ATF-aasi aktiivsus oli katsete alustamisel kõrge, langes see humisooli toimel märgatavalt.

Humisoolikuuri lõpuks tõusis erütrotsüütide ATF-aasi aktiivsus uuesti kõrgele tasemele, ületades esimeses katseseerias lähteväärtuse isegi tunduvalt (vt. tabel); teises katseseerias aga saavutas fermendi aktiivsus peaaegu lähteväärtuse.

Põhiliselt mahuvad erütrotsüütide ATF-aasi aktiivsuse muutused kogu oma skaala ulatuses katseloomade ATF-aasi aktiivsuse individuaalsete lähteväärtuste üldise suure hajutatuse ehk dispersiooni raamidesse. See tähendab seda, et kuuri esimesel poolel suunab humisool ATF-aasi aktiivsuse kõige madalamale, kuuri teisel poolel aga tagasi kõrgeimale tasemele. Igal üksikul juhul võib see kulgeda mõnevõrra erinevalt ning mõningate pendeldustega, nagu näitab ATF-aasi aktiivsuse dünaamika individuaalne kõver esimeses katseseerias küülik nr. 3. puhul. Sellest kõverast nähtub, et erütrotsüütide ATF-aasi aktiivsus langeb kõige madalamale 5. katsepäeval, tõuseb 7. päevaks peaaegu esialgsele tasemele ja langeb uuesti 10. katsepäevaks. Seejärel hakkab ATF-aasi aktiivsus jälle tõusma ning saavutab kõrgeima taseme humisoolikuuri lõpuks.



Joon. 1. Küüliku erütrotsüütide ATF-aasi aktiivsuse dünaamika humisoolikuuri puhul (I katseseeria, küülik nr. 3).



ATF-aasi aktiivsuse maksimaalse languse periood kõnesolevates katsetes on näiliselt üsna pikk. Esimeses katseseerias täheldati maksimaalset langust 10. katsepäeval, teises seerias 8. ja kolmandas alles 15. katsepäeval. Seega langeb ATF-aasi minimaalse aktiivsuse ilmumine ajaliselt ligikaudu kokku balneo-reaktsiooni avaldumisega mudaravi puhul. Võimalik, et nende vahel on teatav patogeneetiline seos.

Humisooli toimet erütrotsüütide ATF-aasi aktiivsusesse *in vitro* tingimustes näitab joonis 2. Siin esitatud andmetest selgub, et humisool lahjenduses 10^{-5} ** pär-

Joon. 2. Humisooli erinevate kontsentratsioonide pärssiv toime erütrotsüütide ATF-aasi aktiivsusesse.

** Humisooli lisandused inkubatsioonisegus antakse preparaadi lõplahjenduste näol.

sib kõige tugevamalt ATF-aasi aktiivsust (ühel küülikul isegi 83,6%). Humisoolikontsentratsiooni tõustes vähenes fermendi aktiivsuse pärssimine väga oluliselt. See vähenes oluliselt ka humisoolikontsentratsiooni langedes tasemele 10^{-9} ... 10^{-10} , kuid mitte täiesti reeglipäraselt. Ühel küülikul tõusis erütrotsüütide ATF-aasi aktiivsus isegi tunduvalt kõrgemale kontrollväärtusest.

Uurimistulemuste arutelu

Käesolev töö näitas, et humisool pärssib erütrotsüütide ATF-aasi aktiivsust nii *in vitro* kui ka *in vivo*. ATF-aasi aktiivsuse maksimaalne langus *in vitro* oli 83,6%. Umbes niisama palju langes ta ka *in vivo* ja seda humisooli manustamise 8., 10. või alles 15. päevaks. Seejärel hakkas fermendi aktiivsus regulaarselt tõusma. Võib arvata, et humisoolikuuri esimesel poolel täheldatud ATF-aasi aktiivsuse tunduvalt langus seletub preparaadi vahetu toimega selle fermendi aktiivsusesse. Humisoolikuuri teisel poolel esinevat fermendi aktiivsuse taastumist, samuti ka katse-eelsete väärtuste ületamist tuleb aga vaadelda juba organismi vastusreaktsioonina preparaadi kestvale toimele. Näib tõepärasena, et humisooli kui ATF-aasi aktiivsust pärssiva faktori kuuriviisi manustamine aktiveerib omakorda selle fermendi aktiivsust reguleerivaid mehhanisme. Selline seisukoht väärrib kahtlemata edasiuurimist, seda enam et uemate andmete alusel sisaldavad rakud nii ATF-aasi inhibiitoreid kui ka stimulaatoreid (Пульмен, Гарбер, 1962). Kui arvestada, et kroonilised haigusseisundid iseloomustavad fermentisüsteemide aktiivsuse regulatsiooni seiskumisega, siis tohiks meie poolt täheldatud biostimulatsiooni mehhanismil olla suur tähtsus humisooli ravitoime selgitamises. Siinjuures pole liigne märkida, et biostimulatsiooni mehhanismide kohta pole seni veel ühtki vastuvõetavat biokeemilist kontseptsiooni esitatud, nagu nähtub ka Bakardjiewi (1964) ülevaateartiklist.

Kuna erütrotsüüdid sisaldavad membraan-ATF-aasi (Garzó jt., 1952), siis on humisool ilmselt just selle fermendi spetsiifiline inhibiitor. Kas viimane mõjustab ka kaaliumi- ja naatriumi-ioonide transportimist erütrotsüüdi membraanis analoogiliselt ouabainiga, see vajab veel spetsiaalselt uurimist.

Kõneldes humisoolist kui ATF-aasi inhibiitorist, on oluline alla kriipsutada ka temale omast «lahjendusefekti», s. t. omadust toimida suurtes lahjendustes (10^{-6} ... 10^{-8}) märksa efektiivsemalt kui tugevates kontsentratsioonides (vt. joon. 2). Selline omadus on iseloomustav helatühendeid moodustavatele ainetele (Альберт, 1960; Покровский, 1962). Et humisoolis on helataineks humiinapped, mis on afiinsed kaltsiumi-, magneesiumi- ja metalli-ioonide suhtes, siis tõenäoliselt just need on membraan-ATF-aasi aktiivsust pärssivaks faktoriks. Muide on teada, et etüleendi-amiintetraäädikhappenaatrium (EDTA) kui tüüpiline helataine pärssib tugevasti erütrotsüüdi ja lihase müosiini ATF-aasi aktiivsust. Erinevalt humisoolist toimib EDTA konnalt isoleeritud südamel ilmse positiivse inotropse efektiga. See näitab omakorda, et humisool oma farmakoloogilise toime poolest erineb ka sellest helatainest, olgugi et nad mõlemad ATF-aasi aktiivsust pärssivad. On huvitav märkida, et nii EDTA kui ka humisool kaitsevad oksüdatiivset fosforüleerumist teda lahutavate faktorite toime vastu (Скулачев, 1962; Sibul, 1966).

Esitatust nähtub, et humisoolile omane erütrotsüütide membraan-ATF-aasi aktiivsust pärssiv toime võiks olla määrava tähtsusega selle preparaadi raviomaduste hindamisel. Kahjuks on meie andmed selles suhtes veel küllalt lünklikud ega luba veel mõtet humisooli membraani-

funktsiooni reguleerivast toimest lõpuni arendada. Meie poolt esitatud faktid on aga kahtlemata küllaldased selleks, et püstitada see probleem kui üks perspektiivseid uurimissuundi, mille edasiarendamisest peaks olema huvitatud eriti meie vabariik oma kõrgeväärtusliku ravimuda tõttu.

Kokkuvõte

Humisoolikuur pärsib nii *in vitro* kui ka *in vivo* küüliku erütrotsüütide ATF-aasi aktiivsust üsna olulisel määral (kuni 83,6%). Humisool sisaldab tõenäoliselt selle fermenti spetsiifilist inhibiitorit, milleks arvatakse on humiin happed. Analoogiliselt teiste ATF-aasi inhibiitoritega (ouaubain ja EDTA) võib arvata, et ka humisooli pärssival toimel ATF-aasi aktiivsusesse on oma tähtsus selle uue ravimpreparaadi toimemehhanismis.

KIRJANDUS

- Bakardjiew W. K., 1964. Die Moortherapie als Stimulationstherapie. Arch. phys. Therapie 16 : 448—461.
- Garzó T., Ullmann A., Straub F. B., 1952. Die Adenosintrifosfatase der roten Blutkörperchen. Acta Physiol. Hung. 3 : 513—522.
- Knoll J., Balázsi J., Knoll B., Kelemen K., 1957. The cardiotoxic effect of disodium ethylenediamin tetraacetic-acid (EDTA, Complexon III) on the isolated frogs heart. Acta Physiol. Hung. 12 : 183—188.
- Nakao T., Nagano K., Adachi K., Nakao M., 1963. Separation of two ATP-ases from Erythrocyte Membrane. Biochem. Biophys. Res. Communications 13 : 444—448.
- Post R. L., Merrit C. R., Kinslowing C. R., Albright C. D., 1960. Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte. J. Biol. Chem. (235) : 1796—1802.
- Repke K., 1965. Effect of Digitalis on membrane adenosine triphosphatase of cardiac muscle. Drugs and enzymes. Czechoslovak Medical Press : 65—86.
- Sibul I., 1966. Fosforüleerumise ja hingamise seose tugevnemisest humisooli toimel. ENSV TA Toimet., Biol. Seeria 15 (3) : 418—422.
- Skou J. C., 1965. Enzymatic basis for active transport of Na⁺ and K⁺ across cell membrane. Physiol. Revs 45 : 596—615.
- Венкстерн Т. В., Энгельгардт В. А., 1955. Поверхностно-локализованная аденозинполифосфатаза ядерных эритроцитов. Докл. АН СССР (102) : 133—136.
- Венкстерн Т. В., Энгельгардт В. А., 1957. Распространение экто-аденозинполифосфатазы и характеристика некоторых ее свойств. Биохимия (22) : 911—916.
- Альберт Э., 1960. Метало-связывающие агенты в химиотерапии: активация металлов путем образования хелатных соединений. В кн.: Стратегия химиотерапии : 135—165. М. (ИЛ).
- Покровский А. А., 1962. О механизмах взаимодействия токсических веществ с ферментными системами. В кн.: Химические основы процессов жизнедеятельности : 291—311. М.
- Пульмен М. Э., Гарбер Е. Р., 1962. Природный ингибитор митохондриальной аденозинтрифосфатазы. Тр. пятого международного биохим. конгресса, Рефераты секционных сообщений (14—28) : 402.
- Сибуль И. К., 1960. О действии фракции гуминовых кислот эстонской лечебной грязи на активность некоторых ферментов животного организма. В сб.: Первая биохим. конф. прибалт. республик и Белоруссии, Тарту 15—19 сентября 1960 г. : 125—126.
- Сибуль И. К., 1961. К механизму терапевтического действия препарата «Гумизоль», изготовленного из эстонской морской лечебной грязи. Тр. Ин-та эксперим. медицины АН ЛитССР. Ревматизм II : 277—284. Вильнюс.
- Сибуль И. К., 1962. Биохимическая характеристика лечебного действия грязевого препарата гумизоль. В сб.: Пятый биохим. конгр., Рефераты секционных сообщений 2 : 262.

Сибуль И. К., 1963. Экспериментальные данные к механизму лечебного действия гумизоля. В сб.: Тр. по курортологии 1 : 5—7, 38—49.

Скулачев В. П., 1962. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М.

Tartu Riiklik Ülikool

Saabus toimetusse
13. IV 1966

И. СИБУЛЬ

ДЕЙСТВИЕ ГУМИЗОЛЯ НА АКТИВНОСТЬ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗЫ (АТФ-аза) ЭРИТРОЦИТОВ*

Резюме

Ранее проведенные нами исследования показали, что гумизоль при однократном парентеральном введении белым мышам угнетает активность АТФ-азы и ацетилхолинэстеразы мозговой ткани (Сибуль, 1961, 1963). В связи с этим в настоящей работе изучалось действие гумизоля на активность АТФ-азы эритроцитов при курсовом введении препарата в течение 20—25 дней подопытным кроликам, а также при непосредственном добавлении его к гемолизатам.

Кроликам весом по 4—5 кг ежедневно вводили парентерально по 1 мл гумизоля, разведенного физиологическим раствором хлорида натрия 1 : 100. Для определения активности АТФ-азы эритроциты трижды отмывали раствором поваренной соли, а затем проводили гемолиз с ледяной дистиллированной водой в соотношении 1 : 2 с последующим охлаждением на льду в течение 15 минут. Активность АТФ-азы определяли по принципу Дюбуа-Поттера инкубированием гемолизата с соответствующей смесью реактивов в течение 30 минут при 37°С.

В результате повторных парентеральных введений гумизоля кроликам в активности АТФ-азы эритроцитов возникали закономерно направленные динамические изменения. В первой половине курса активность АТФ-азы постепенно снижалась и к концу этой половины достигала относительно низкого уровня, а к концу курса достигала наивысшего уровня.

Непосредственное добавление гумизоля к гомогенатам показало явное торможение АТФ-азы, степень которого зависела от разведения препарата в инкубационной смеси. Наивысшее торможение было обнаружено при разведении препарата на 10^{-5} , причем у одного кролика оно достигло даже 83,6%. При еще более высоких разведениях активность фермента большей частью восстанавливалась и в одном случае была даже значительно выше исходного уровня.

Полученные данные о действии гумизоля на активность АТФ-азы эритроцитов как *in vivo*, так и *in vitro*, позволяют предположить, что гумизоль, или вернее какая-то его часть, является специфическим ингибитором АТФ-азы, которая в эритроцитах является в основном типа мембранного фермента. Предполагается, что снижение активности АТФ-азы эритроцитов в первой половине курса гумизоля вызывается его непосредственным тормозящим действием на этот фермент, а последующее повышение активности во второй половине курса — реакцией со стороны организма.

Разумеется, что вышеуказанные фармако-биохимические свойства гумизоля по отношению АТФ-азы позволяют вскрыть сущность терапевтического действия этого препарата при лечении многих хронических заболеваний.

Тартуский государственный университет

Поступила в редакцию
13/IV 1966

* Работа выполнена в Институте экспериментальной и клинической медицины АН ЭССР в 1963 г.

I. SIBUL

DIE WIRKUNG VON HUMISOL AUF DIE ADENOSINTRIPHOSPHATASE
(ATP-ase) VON ERYTHROZYTEN*

Zusammenfassung

Das aus estnischem Heilschlamm gewonnene Präparat Humisol verursacht bei weissen Mäusen nach parenteraler Verabreichung eine deutliche Abnahme der ATP-ase-Aktivität in Gehirnhomogenaten (Сибуль, 1960, 1963). Vorliegende Arbeit berichtet über die Untersuchungen der Wirkung von Humisol auf die ATP-ase-Aktivität von Erythrozyten.

Erwachsenen Kaninchen (Körpergewicht 4—5 kg) wurde im Verlaufe von 20—25 Tagen alltäglich 1 cm³ Humisol verdünnt 1 : 100 in isotonischer NaCl-Lösung subcutan verabreicht. Die Aktivität der ATP-ase von Erythrozyten wurde nach der Methode von Dubois und Potter periodisch untersucht. Es wurde festgestellt, dass die Aktivität der ATP-ase während des Humisolkurses einigen bestimmten dynamischen Veränderungen unterworfen ist. Nämlich beobachtete man in der ersten Hälfte des Kurses eine allmähliche Abnahme, in der zweiten Hälfte dagegen eine bedeutende Zunahme der ATP-ase-Aktivität. Infolgedessen wurden in der Mitte des Versuches die niedrigsten, am Ende dagegen die höchsten Werte beobachtet.

Humisol erwies sich auch *in vitro* als ein sehr wirksames Präparat. Die ausgeprägte Hemmung (50%) der ATP-ase von Hämolysaten wurde bei einer Endkonzentration von 10⁻⁶ bis 10⁻⁸ des Humisols beobachtet. Charakteristisch war der sogenannte «Verdünnungseffekt», demzufolge die höheren Konzentrationen des Präparats eine schwache, die niedrigeren eine starke Wirkung ausüben. Daraus konnte gefolgert werden, dass die im Präparat enthaltenen Huminsäuren als Chelatverbindungen für die Hemmung der ATP-ase verantwortlich sind.

Die ausgeprägte Hemmung der ATP-ase durch Humisol *in vitro* und *in vivo* spricht eindeutig für die Annahme, dass das Präparat einen spezifischen Membran-ATP-ase Inhibitor enthält. Durch die Wirkung dieses Faktors ist auch die Abnahme der ATP-ase-Aktivität von Erythrozyten in der ersten Hälfte des Humisolkurses zu erklären. Die in der zweiten Hälfte des Kurses festgestellte Zunahme der Aktivität lässt sich jedoch nur als eine Antwortreaktion seitens des Organismus erklären, deren Mechanismen noch weiterer Untersuchungen bedürfen.

Es wird angenommen, dass die geschilderten pharmakobiochemischen Eigenschaften des Humisols einige neue Vorstellungen über das Wesen der therapeutischen Wirkungsmechanismen des estnischen Heilschlammes und der daraus gewonnenen Präparate gestatten.

Tartuer Staatsuniversität

Eingegangen
am 13. April 1966

* Die Arbeit wurde im Institut für Experimentelle und Klinische Medizin der Akademie der Estnischen SSR im Jahre 1963 ausgeführt.